

Вплив антиоксидантів на корекцію пероксидного окислення ліпідів у хворих на екзему

Паращук Б.М., Асцатуров Г.Є., Білинська О.А.

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ НА КОРЕКЦИЮ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ У БОЛЬНЫХ ЭКЗЕМОЙ

Паращук Б.М., Асцатуров Г.Е., Билинская О.А.

Проведено дослідження змін перекисного окислення ліпідів (дієнові кон'югати – ДК, малоновий діальдегід – МДА) і антиоксидантної системи організму (активність каталази – АК, коефіцієнт антиоксидантної активності – K_{AOA}) у 29 хворих екземой. Установлено збільшення (в 2,25 рази) у хворих екземой концентрації ДК, а також збільшення (в 1,5 рази) концентрації МДА. Паралельно у хворих екземой знижувалась АК (в 3,92 рази) і незначительно збільшувалась K_{AOA} (в 1,1 рази), що, очевидно, пов'язано з виходом антиоксидантних ферментів при руйнуванні пошкоджених клітин хворих екземой.

INFLUENCE OF ANTIOXIDANTS ON LIPID PEROXIDATION CORRECTION IN PATIENTS WITH ECZEMA

Parashchuk B.M., Astsaturov H.Ye., Bilynska O.A.

Changes in lipid peroxidation (dienic conjugates – DC, malonic dialdehyde – MD) and the organism's antioxidant system (catalase activity – CA, antioxidant activity coefficient – K_{AOA}) have been studied in 29 patients with eczema. It was found that DC concentration increased 2,25 times while MDA concentration increased 1,50 times in patients with eczema. Simultaneously, CA decreased 3,92 times and K_{AOA} slightly increased (1,1 times). It might be a result of antioxidant enzymes release during the destruction of affected cells in patients with eczema.

За останні роки в силу ряду об'єктивних причин (стресові ситуації, екологічні катаклізми тощо) значно збільшилась частота тяжких та хронічних дерматозів, серед яких на одному з перших місць знаходиться екзема. Згідно сучасним даним, екзему розглядають як хронічний, рецидивуючий дерматоз з гострозапальними симптомами, які обумовлені серозним запаленням епідермісу та дерми [1, 2, 4]. Патогенетичний процес формування екземи включає комплекс не конкуруючих, а доповнюючих один одного нейроімунореактивних, інфекційно-алергічних та метаболічних механізмів, серед яких чільне місце займає [2, 3]:

- порушення обміну ліпідів;
- інтенсифікація процесів їх пероксидного окислення (ПОЛ);
- активація гідролаз лізосом.

Надмірна активація процесів ПОЛ при зниженій активності біоантиоксидантної системи організму може призвести до значних патологічних змін, які, в першу чергу, супроводжуються пошкодженням субклітинних та клітинних мембран

[9, 10]. Продукти ПОЛ викликають порушення не тільки ліпід-ліпідних зв'язків в біомембранах, але і їх білкового компоненту – за рахунок зв'язування з аміноними групами, що призводить до порушення білково-ліпідної взаємодії. Вільнорадикальне окиснення ліпідів викликає зміни еластичних волокон, ініціює фібропластичні процеси та старіння колагену [2, 3].

Мета дослідження – підвищення ефективності лікування хворих на екзему шляхом розробки обґрунтованого методу лікування на підставі вивчення ПОЛ та антиоксидантного захисту (АОЗ).

Матеріали та методи дослідження. У комплекс обстеження було включено методики для оцінки змін у системі ПОЛ-АОЗ у хворих на істинну екзему. Рівень ПОЛ оцінювали за вмістом первинних (дієнові кон'югати – ДК) та проміжних (малоновий діальдегід – МДА або ТБК-активні продукти) метаболітів. Загальну антиокисну активність визначали за коефіцієнтом K_{AOA} . У дослідженнях визначали активність ензиму антипероксидної дії – каталази.

Усі біохімічні дослідження проводилися на

базі центральної науково-дослідної лабораторії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького.

Визначення вмісту малонового діальдегіду (МДА) проводили спектрофотометрично за методом Р. А. Тімірбулатова [2, 5]. Для проведення аналізу після 10-хвилинної інкубації сироватки крові, розведеної 0,1-молярним фосфатним буфером ($pH=7,4$) з додаванням 1-молярного розчину перманганату калію та 10-молярного розчину закисного сірчанокислого заліза, проводили реакцію з 2-тіобарбітуровою кислотою. Принцип методу ґрунтується на тому, що при високій температурі в кислому середовищі малоновий діальдегід реагує з 2-тіобарбітуровою кислотою з утворенням забарвленого триметинового комплексу з максимумом поглинання при 532 нм.

Екстинкцію розчину визначали спектрофотометрично при 532 нм. Коефіцієнт молярної екстинкції дорівнює $1,56 \cdot 10^{-1} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Вміст дієнових кон'югатів (ДК) визначали за методом В. Б. Гаврилова і М. І. Мишкорудної [2, 4]. Підчас пероксидного окиснення ліпідів на стадії утворення вільних радикалів у молекулах поліненасичених вищих жирних кислот виникає система спряжених подвійних зв'язків, з утворенням кон'югованих дієнів, що супроводжується появою нового максимуму в спектрі поглинання при хвилі 233 нм. Як антикоагулянт, використовували ЕДТА (1 мг/кг).

Для аналізу до 0,2 мл плазми крові добавляли 4 мл гептан-ізопропанолової суміші (1:1) і змішували 30 хв. на лабораторному змішувачі. Розділення гептанових і водно-ізопропанолової фаз здійснювали додаванням розчину соляної кислоти. Після відстоювання і розшарування суміші відбирали гептановий шар, в якому вимірювали ацетилгідроперекиси по ступеню світлопоглинання при довжині хвилі 233 нм. Як контрольну пробу, використовували зразок, що містив замість плазми 0,2 мл H_2O .

Результати дослідження вимірювали у відносних одиницях величини оптичної густини на 1 мл крові (оскільки розрахунок молярної концентрації ацилгідроперекисів для складної суміші ліпідів здійснити практично неможливо):

- концентрація дієнових кон'югатів у здорових осіб коливалась у межах 2,0-3,5 од Е/мл, становлячи в середньому $2,5 \pm 0,4$ од Е/мл;

- концентрація малонового діальдегіду коливалась у межах 95-110 мкмоль/мл, становлячи в середньому $105,4 \pm 0,8$ мкмоль/мл.

Для характеристики загальної антиоксидант-

ної активності організму (АОА) використовували співвідношення нагромадження МДА при активації ПОЛ за методом В. Б. Мартинюк, М. Ф. Тимочко і співав. для двох різних кількостей досліджуваного матеріалу у постійному об'ємі середовища інкубації [2]. Це співвідношення позначалося K_{AOA} (коефіцієнт антиоксидантної активності) і розраховувалося за формулою:

$$K_{AOA} = \frac{E_1 \cdot m_2}{E_2 \cdot m_1},$$

де E_1, E_2 – оптична густина двох проб;

m_1, m_2 – кількість матеріалу в цих пробах.

K_{AOA} виражається в умовних одиницях (у.о.).

Метод дає можливість оцінити загальну антиокислювальну активність досліджуваного матеріалу з урахуванням не лише гідрофобних антирадикальних факторів, але й гідрофільних факторів і ферментів протиокисної дії, що має важливе значення для досліджування особливостей перебігу ПОЛ у тканинах живого організму.

Визначення активності каталази проводились за методом М. А. Королюка [2]. Принцип методу базується на здатності пероксиду водню утворювати з солями молібдату стійкий забарвлений комплекс. Забарвлений розчин спектрофотометрувався при довжині хвилі 410 нм. Отриману оптичну густину переводили в кмоль H_2O_2 /мл·год.

Активність каталази у здорових осіб коливалась у межах 0,08-0,13 мкмоль H_2O_2 /мл·год, складаючи в середньому $0,11 \pm 0,01$ мкмоль H_2O_2 /мл·год, а значення K_{AOA} у здорових осіб коливалась в межах 1,23-1,38 у. о., складаючи в середньому $1,35 \pm 0,03$ у. о.

Результати та їх обговорення. Було обстежено 19 хворих на істинну екзему. Зміни показників ПОЛ-АОЗ у хворих з екземою наведені в табл. 1.

Як видно з табл. 1, у хворих на істинну екзему спостерігаються різкі зміни показників ПОЛ:

- величина ДК була вірогідно збільшена стосовно норми в 2,25 разу та становила $5,62 \pm 0,38$ одЕ/мл.

- кінцевий продукт ПОЛ – малоновий діальдегід збільшився в 1,50 разу і становив $157,50 \pm 12,34$ мкмоль/мл;

- зафіксовано статистично достовірне пригнічення активності каталази у крові хворих: у порівнянні з нормою активність ферменту зменшувалась у 3,92 разу і становила $0,028 \pm 0,001$ мкмоль H_2O_2 /мл год, що є статистично достовірним ($p < 0,001$);

Таблиця 1 - Показники АОС і ПОЛ у хворих на істинну екзему ($M \pm m$)

Показник	Розмірність	Здорові ($n = 20$)	Хворі на істинну екзему ($n = 19$)	P
		1	2	P_{1-2}
ДК	одЕ/мл	$2,50 \pm 0,14$	$5,62 \pm 0,38$	$< 0,001$
МДА	мкмоль/мл	$105,40 \pm 7,81$	$157,50 \pm 12,34$	$< 0,001$
Каталаза	мкмоль H_2O_2 /мл год.	$0,11 \pm 0,01$	$0,028 \pm 0,001$	$< 0,001$
K_{AOA}	у. о.	$1,35 \pm 0,02$	$1,50 \pm 0,03$	$< 0,001$

- величина K_{AOA} збільшувалась до $1,50 \pm 0,03$ у. о., що може свідчити про вихід сполук з антиокислювальними властивостями у кров'яне русло внаслідок розпаду уражених клітин хворих, що спричиняє підвищення загальної антиокислювальної активності у крові хворих.

Отже, проведені дослідження у хворих на істинну екзему вказують на зміну балансу у системі ПОЛ–АОА за рахунок надмірної активації вільнорадикального ПОЛ та виснаження окремих ланок антиоксидантного ферментативного захисту. При цьому ймовірним є зсув рівноваги у системі кисневозалежного метаболізму, який може виявлятися в пригніченні аеробного енергообміну з порушенням відновних синтетичних процесів.

Враховуючи одержані нами дані про зміни показників ПОЛ та АОЗ у хворих на істинну екзему, було вирішено застосувати та апробувати в комплексній терапії для лікування цих хворих розчин

сукцинату натрію. Сукцинат натрію – 1,5-відсотковий розчин для інфузій (400 мл), представляє собою ізотонічну композицію солі янтарної кислоти, яка при парентеральному введенні:

- дає дезінтоксикаційний, антиоксидантний, антигіпоксантичний та енергопротективний ефект;
- знижує продукцію вільних радикалів;
- утилізує жирні кислоти і глюкозу в клітинах;
- нормалізує кислотно-основну рівновагу та газовий склад крові.

Сукцинат натрію застосовувався у вигляді 1,5-відсоткового розчину способом внутрішньовенної інфузії, краплинно (40 крапель за хв.) в об'ємі 400 мл протягом трьох діб, оскільки із літературних джерел відомо, що саме цей термін вважається одним з перехідних періодів при формуванні неспецифічних пристосувальних реакцій. Результати, одержані нами при дослідженні, наведені в табл. 2.

Таблиця 2 - Показники АОС і ПОЛ у крові хворих на істинну екзему під час лікування сукцинатом натрію ($M \pm m$)

Показники	Розмірність	Здорові ($n = 30$)	Хворі на істинну екзему		P	
			До лікування ($n = 19$)	Після застосування сукцинату натрію ($n = 19$)	P_{2-3}	P_{1-3}
			2	3		
ДК	одЕ/мл	$2,50 \pm 0,14$	$5,60 \pm 0,41$	$3,00 \pm 0,23$	$< 0,001$	NS
МДА	мкмоль/мл	$105,40 \pm 7,81$	$157,50 \pm 10,92$	$103,50 \pm 0,72$	$< 0,001$	NS
Каталаза	мкмоль H_2O_2 /мл год.	$0,11 \pm 0,01$	$0,028 \pm 0,002$	$0,078 \pm 0,003$	$< 0,001$	$< 0,001$
K_{AOA}	у. о.	$1,35 \pm 0,02$	$1,50 \pm 0,02$	$1,71 \pm 0,03$	$< 0,001$	$< 0,001$

Як видно з табл. 2, у хворих на істинну екзему спостерігалась тенденція до нормалізації окремих досліджуваних показників системи ПОЛ–АОА на третій день лікування із застосуванням сукцинату натрію:

- концентрація ДК вірогідно ($p < 0,001$) зменшувалась і на третій день лікування нормалізувалась в усіх хворих і статистично не відрізнялась від цього показника у здорових осіб.

- така ж тенденція спостерігалась і з МДА, який на третій день нормалізувався в усіх хворих і статистично не відрізнявся від цього показника у здорових осіб.

На фоні введення розчину сукцинату натрію у хворих на екзему ще більше зросла загальна антиоксидантна активність, яка характеризувалась величиною K_{AOA} . Таке явище ми можемо пояснити вираженою антиокислювальною активністю сукцинату натрію, що приводить до мобілізації клітинами організму сполук з антиоксидантними властивостями з їх наступним звільненням у кров. Необхідно відмітити, що наростання K_{AOA} , який в цілому характеризує сумарну антиоксидантну активність ферментативного та неферментативного компонентів, за умов застосування сукцинату натрію корелює з активацією каталази.

Висновки

1. Судячи з проведених досліджень, можна зробити узагальнюючий висновок про істотну роль змін рівноваги у системі ПОЛ–АОА при розвитку істинної екземи.

2. Нами встановлено інтенсифікацію процесів ПОЛ, яка виявлялась достовірним збільшенням як первинних, так і проміжних їх метаболітів. Це вказує на певну специфіку механізмів ініціацій та підтримання пулу оксигеназних реакцій при розвитку істинної екземи.

3. Водночас, встановлено наростання величини $K_{АОА}$, котрий може бути характеристикою загальної антиоксидативної активності, яка включає ферментативні та неферментативні компоненти. Враховуючи різке зниження активності каталази та зважаючи, що ферменти з антиоксидантною здатністю функціонують кооперативно, таке зростання ми пов'язуємо з вкладом сполук з антиокисними властивостями, висока концентрація яких у сироватці крові може

бути пов'язана з деструктивними процесами у епітеліальних клітинах і потраплянням внаслідок цього антиоксидантів у кровоносне русло у хворих на істинну екзему.

4. Нормалізуючий, стосовно параметрів ПОЛ–АОА, ефект сукцинату натрію, судячи з даних літератури, а також власних спостережень, більшою мірою може бути пов'язаний з властивостями даного хімічного препарату, який, будучи активним антиоксидантом, може істотно впливати на кислотно-лужну рівновагу, видозмінювати перебіг окисно-відновних процесів [6-8]. Такий вплив може бути ініціюючою ланкою, котра значною мірою видозмінює весь хід обмінних перетворень при перебігу істинної екземи, забезпечуючи покращення якості компенсаторних процесів при цій патології. Головною метаболічною системою, котра мобілізується при дії сукцинату натрію, є обмін недоокислених метаболітів та підтримання оптимальної активності систем АОЗ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Денисенко О.І. Стан антиоксидантної системи крові у хворих на алергодерматози // Буков. мед. вісник. - 2005. - Т. 9, № 2. - С. 83-84.
2. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. - Минск: Беларусь, 2000. - 280 с.
3. Болотная Л.А. Роль ПОЛ в патогенезе экземы // Дерматология, венерология. - 2003. - № 4. - С. 36-39.
4. Стальная И.Д. Определение диеновых конъюгатов ацетилгидроперекисей // Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Орехова. - М.: Медицина, 1997. - С. 63-64.
5. Стальная И.Д., Гарнашвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Орехова. - М.: Медицина, 1997. - С. 66-68.
6. Тимочко М.Ф., Кобилінська Л.І. Вільнорадикальні реакції та їх метаболічна роль // Медична хімія. - 1999. - Т. 1. - С. 19-25.
7. Рябова О.О. Сучасні аспекти фармакотерапії екземи / О. О. Рябова // Клінічна фармація. - 2006. - Т. 10, №4. - С. 10-14.
8. Перспективи застосування антиексудативної дії препаратів, що містять СОД у дерматології / Деримедвідь Л.В., Карташевський І.Г., Слободянюк Т.А. та ін. // Ліки. - 1999. - № 2. - С. 79.
9. Briganti S., Picardo M. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new // J. EADV. - 2003. - Vol. 17. - P. 663-669.
10. Sander C.S., Hong Chang. Role of oxidative stress on patients with eczema (atopic/nonatopic) and allergic sensitization // Allerg. - 2005. - Vol. 60. - P. 1014-1020.